


 WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
 Internationales Büro
 INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
 INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ : <p style="text-align: center; font-weight: bold;">C12P 19/04, 39/00</p>	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/08201 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 17. Februar 2000 (17.02.00)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/05681 (22) Internationales Anmeldedatum: 5. August 1999 (05.08.99) (30) Prioritätsdaten: 198 35 767.2 7. August 1998 (07.08.98) DE (71)(72) Anmelder und Erfinder: KULICKE, Werner-Michael [DE/DE]; Schachblumenweg 12, D-22523 Hamburg (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): KATH, Franziskus, Karl, Thomas [DE/DE]; Wrangelstrasse 90, D-20253 Hamburg (DE). (74) Anwalt: SCHMIDT-BOGATZKY, Jürgen; Lüneburger Tor 4, D-21073 Hamburg (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, CN, JP, US, ZA, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>
(54) Title: METHOD FOR OBTAINING HIGH-MOLECULAR BIOLOGICALLY ACTIVE IMMUNOMODULATING POLYSACCHARIDES FROM SACCHAROMYCES CEREVISIAE YEAST (54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR GEWINNUNG HOCHMOLEKULARER BIOLOGISCH AKTIVER IMMUNMODULIERENDER POLYSACCHARIDE AUS HEFE SACCHAROMYCES CEREVISIAE (57) Abstract <p>The invention relates to a method for obtaining high molecular biologically active immunomodulating polysaccharide from <i>Saccharomyces cerevisiae</i> yeast. In a first step, the yeast cells are mechanically disintegrated under the effect of shear forces in such a way that the cell walls are separated from the inner part of the cell. In a second step, the cell wall material obtained is purified and dried. The cell wall material is then subjected to enzymatic digestion in a third step and the aqueous insoluble glucan thus formed is obtained as a solid by centrifugation and the aqueous soluble mannan is obtained in the supernatant. Said method makes it possible to obtain high yields of glucan and mannan with intact native structure.</p> (57) Zusammenfassung <p>Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Gewinnung hochmolekularer biologisch aktiver immunmodulierender Polysaccharide aus Hefe <i>Saccharomyces Cerevisiae</i>. In einer ersten Verfahrensstufe werden die Hefezellen durch Einwirkung von Scherkräften mechanisch soweit zerrissen, daß die Zellwände vom Zellinneren getrennt sind. Die Zellwandbestandteile werden von den Bestandteilen des Zellinneren getrennt. In einer zweiten Verfahrensstufe wird dann das gewonnene Zellwandmaterial gereinigt und getrocknet. Danach wird das Zellwandmaterial in einer dritten Verfahrensstufe einem enzymatischen Aufschluß unterzogen und das hierbei entstehende wasserunlösliche Glucan durch Zentrifugation als Feststoff und das wasserlösliche Mannan im Überstand gewonnen. Durch dieses Verfahren erfolgt eine hohe Ausbeute von Glucan und Mannan mit intakter nativer Struktur.</p>		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland			TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	NZ	Neuseeland		
CM	Kamerun			PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

**Verfahren zur Gewinnung hochmolekularer biologisch aktiver
immunmodulierender Polysaccharide aus Hefe *Saccharomyces Cerevisiae***

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Gewinnung hochmolekularer biologisch aktiver immunmodulierender Polysaccharide aus Hefe *Saccharomyces Cerevisiae*.

Die Bedeutung des Immunsystems zur Abwehr von Krankheiten in menschlichen und tierischen Organismen ist bekannt. Es ist ferner allgemein bekannt, daß es in der Zellwand von Hefe Polysaccharide gibt, die in tierischen und menschlichen Organismen immunstimulierend wirken und zur Abwehr von Krankheiten eingesetzt werden können. Diese Polysaccharide sind Mannan und Glucan. Das Mannan, bestehend aus 1,2-, 1,3- und 1,6- α -glykosidisch verknüpften Mannose-Einheiten, ist an eine Protein-Matrix gebunden und sitzt auf der äußeren Zellwand der Hefezelle, während das Glucan 1,3- β -glykosidisch verknüpft ist mit wenigen 1,6- β -glykosidischen Seitenketten und sich in der inneren Zellwand befindet. Zur Isolierung dieser beiden Polysaccharide wurden zahlreiche Verfahren entwickelt, bei denen durch Einwirkung von Säuren und Laugen die beiden Zellwandkomponenten getrennt werden. Bei diesen herkömmlichen Verfahren sind jedoch viele Verfahrensschritte erforderlich und darüber hinaus wird die native Struktur der Zellwand-Polysaccharide beschädigt, so daß die immunabwehrfördernden Effekte beeinträchtigt werden.

Die Aufgabe der Erfindung besteht darin, das Verfahren der eingangs genannten Art so zu gestalten, daß bei einer Verminderung der erforderlichen Verfahrensschritte ein optimaler immunmodulierender Effekt erzielt wird.

Erfindungsgemäß erfolgt die Lösung der Aufgabe durch die Merkmale des Anspruchs 1. Vorteilhafte Ausgestaltungen der Erfindung werden in den abhängigen Ansprüchen beschrieben.

Nach der Erfindung wird gegenüber den herkömmlichen sauren und alkalischen Extraktionen bei der Isolierung der Polysaccharide eine Degradation vermieden, da durch den Einsatz von Enzymen extreme pH-Werte vermieden werden. Außerdem wird die Anzahl der erforderlichen Verfahrensschritte deutlich reduziert. Gemäß der Erfindung werden zunächst über einen mechanischen Zellaufschluß die Zellwände vom Zellinneren abgetrennt und die erhaltenen Zellwandabschnitte gereinigt und getrocknet. Vorteilhaft ist eine Gefriertrocknung. Es ist aber auch die Anwendung anderer Gefrierverfahren möglich. Dann erfolgt eine Einwirkung von technischen

1 Enzymen auf die isolierten Zellwandabschnitte der Hefe *Saccharomyces Cerevisiae*,
wodurch die Substanzen rein isoliert werden können. Man erhält sowohl Mannan als
auch Glucan, welche direkt für immunstimulierende Zwecke z.B. in Hautcremes
eingesetzt werden können. Da das Glucan in Wasser unlöslich ist, kann es durch
5 chemische Umsetzungen in wasserlösliche Derivate überführt werden. Hierzu sind
zahlreiche Derivatisierungsmethoden bekannt. Es können spezielle Mannan-
Komponenten isoliert werden, die Molmassen im Bereich von 20.000 bis 400.000 g/mol
haben, eine spezifische, immunmodulierende Reaktion zeigen und dabei aber nicht
cytotoxisch wirken. Diese Mannan-Komponenten können unter Umständen auch zur
10 Bekämpfung von Asthma-Erkrankungen genutzt werden, da sie in in vitro Tests eine
immunsuppressive Wirkung zeigten. Zur Isolierung der Polysaccharide können
vorteilhaft kommerzielle Enzyme eingesetzt werden, wie Protease (SIGMA-ALDRICH),
Pronase (MERCK), beide aus *Streptomyces griseus*, Lyticase, auch Zymolyase genannt
(SIGMA-ALDRICH), wie auch Enzymcocktails aus *Helix pomatia* und aus *Cytophaga*
15 (MERCK). Es ist aber auch die Verwendung anderer geeigneter Enzyme oder
Enzymcocktails möglich.

Der Vorteil der enzymatischen Isolierung von Hefeinhaltsstoffen besteht darin, daß
Glucanderivate und Mannan bereits ohne Dosis-Wirkungsoptimierung wirksam sind und
20 dies sogar im in vivo Test zur Überprüfung der Anti-Tumoraktivität. Ein Tumor wächst
auch nach erneuter Inkubation nicht wieder an. Durch Anwendung der Glucanderivate
und Mannan besteht auch keine Toxizität, bzw. nur eine geringe Toxizität.

Das nach der Erfindung gewonnene Mittel kann vielfältig angewandt werden.
25 Für die Wundheilung ist es möglich, das Mittel rein physikalisch als
feuchtigkeitsspeichernde Abdeckung und bei offenen Wunden zur Aktivierung von
Immunzellen zu verwenden. Ferner wirkt das Mittel gegen pathogene Bakterien und
Viren. Außerdem hat das erfindungsgemäße Mittel eine regulierende Wirkung auf
Autoimmunkrankheiten wie z.B. Asthma und Epilepsie.

30 Die Anwendung kann über Salben, Emulsionen, Gellösungen, durch Spritzen oder
Mikroverkapselung, oral durch Pillen oder Lösungen oder intramuskulär z.B. durch
Spritzen in die Bauchhöhle oder intravenös erfolgen, was ein höchstes
Wirkungspotenzial hat. Der Einsatz des erfindungsgemäßen Mittels ist möglich bei HIV-
35 Infektionen, Tumoren sowohl bei Menschen wie auch Tieren, Tuberkulose, akuter
Sepsis, Bakterien, Pilze, gesteigerter Interferonproduktion, zur Steigerung der
Leukozytenzahl, zur Wundheilung wie z.B. zum Schutz vor Strahlenschäden und

1 Infektionen und darüber hinaus zur Erhöhung der Transplantationsimmunität, zur
Bekämpfung von Trauma, zur Erhöhung von Blutbildung und zur Impfunterstützung.
Ferner ist ebenso eine umfangreiche Anwendung bei Tieren zur Immunförderung
möglich.

5

Im folgenden wird das erfindungsgemäße Verfahren anhand der in der Zeichnung
schematisch dargestellten Verfahrensabläufe näher erläutert.

Die Hefezellen 1 werden in der ersten Verfahrensstufe A durch Einwirkung von
10 Scherkräften mechanisch zerrissen, so daß die Zellwände vom Zellinneren getrennt
werden. Hierzu wird ein Mahlbehälter 2 mit einer Suspension aus Hefezellen und
Glasperlen gefüllt und in z.B. einer Schwingmühle 3 mit hoher Frequenz geschüttelt. Als
Glasperlen werden vorzugsweise solche mit einem Durchmesser von 0,75 - 1,5 mm
verwendet. Die Frequenz der Schwingmühle 3 beträgt z.B. 1600 s^{-1} . Das so gewonnene
15 Zellwandmaterial 4 wird dann in einer weiteren Verfahrensstufe B durch Zentrifugation
gereinigt oder aber an mikroporösen Membranen durch Waschen gereinigt. Das so
aufbereitete Zellwandmaterial 4 wird dann gefriergetrocknet. In der dann folgenden
Verfahrensstufe C wird das Zellwandmaterial 4 einem enzymatischen Aufschluß
unterzogen. Spezifische Enzyme wie Pronase oder Glucanase oder spezifische
20 Enzymcocktails wie Zymolyase, Cytophaga, Helicase oder Cellulase zerstören in der
äußeren Zellwand des Zellwandmaterials 4 die Proteinmatrix und setzen lösliches
Mannan 5 frei. Das unlösliche Glucan 6 wird durch Zentrifugation abgetrennt und
gesondert aufbereitet. Das Mannan 5 kann durch Dialyse oder chromatographisch
gereinigt werden.

25

Nachstehend werden zwei Ausführungsbeispiele der Erfindung beschrieben:

1. Ausführungsbeispiel

5,0 g Hefezellwände aus dem mechanischen Aufschluß wurden in 115 ml Trispuffer
30 Lösung (Tri(hydroxymethyl)aminoethan, mit Salzsäure auf $\text{pH} = 7,5$ eingestellt)
suspendiert und auf $37,0^\circ\text{C}$ temperiert. 10,6 mg Pronase E (Streptomyces griseus, Fa.
MERCK) wurden in 5 ml Puffer-Lösung gelöst und zum Reaktionsgemisch
hinzugegeben. Nach sechs Stunden wurde der Feststoff abzentrifugiert und der
Überstand dialysiert. Nach Gefrier Trocknung erhielt man Mannan aus dem Überstand,
35 während im Feststoff 2,9 g Glucan zu finden sind.

2. Ausführungsbeispiel

1,55 g Hefezellwände aus dem mechanischen Aufschluß wurden in 60 ml Trispuffer-Lösung (Tri(hydroxymethyl)aminoethan, mit Salzsäure auf pH = 7,5 eingestellt) suspendiert und auf 37,0°C temperiert. 462 mg Protease (Streptomyces griseus, Fa. SIGMA) wurden in 5 ml Puffer-Lösung gelöst und zum Reaktionsgemisch hinzugegeben. Nach 6,5 Stunden wurde der Feststoff abzentrifugiert und der Überstand dialysiert. Nach Gefriertrocknung erhielt man 352 mg Mannan aus dem Überstand, während im Feststoff 522 mg Glucan zu finden sind.

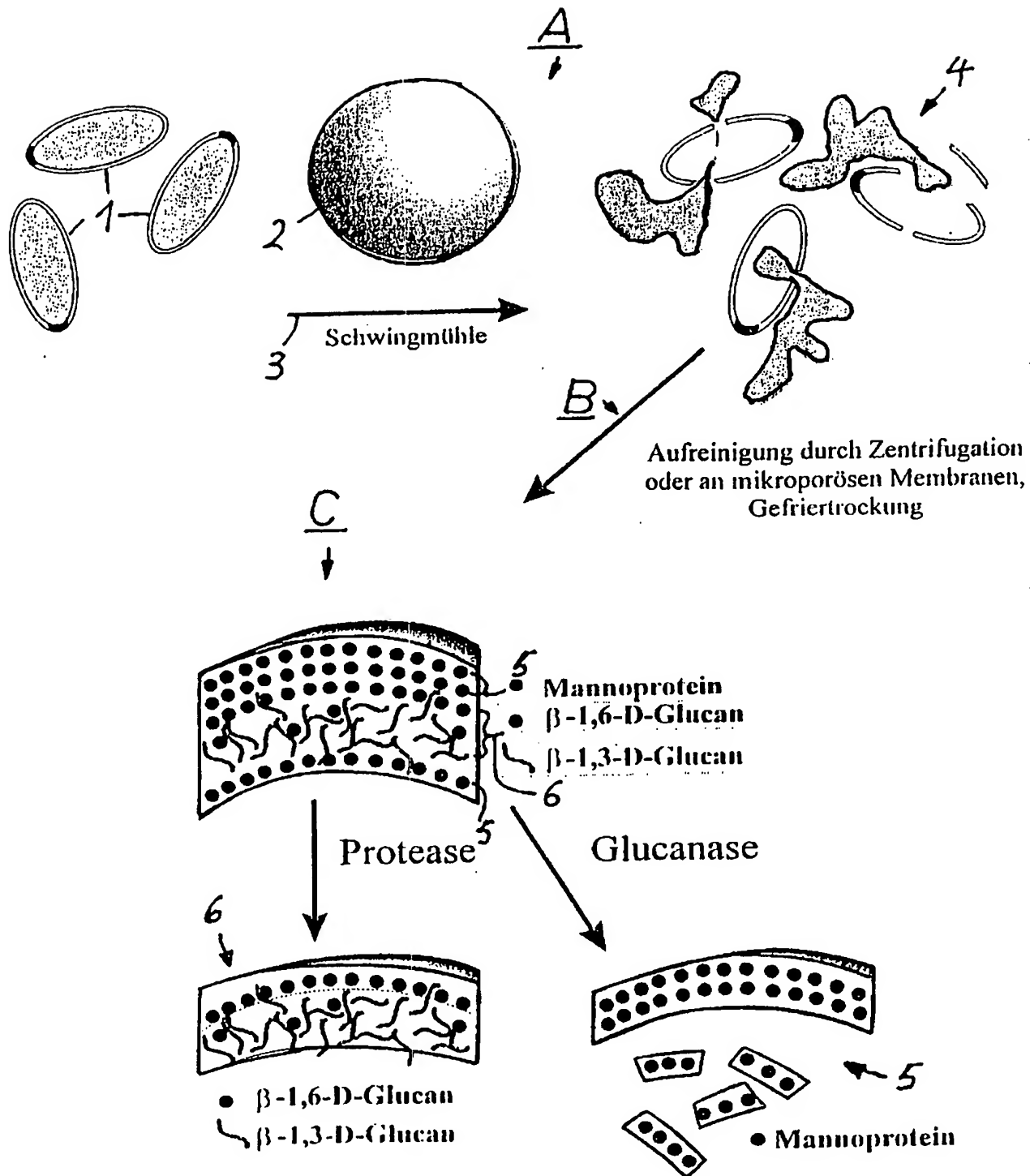
Das gewonnene wasserunlösliche Glucan kann chemisch durch Carboxymethylierung, Phosphatierung, Sulfatierung, Sulfonierung, Glycosidierung oder dergleichen in eine lösliche Form gebracht werden. Bei dem gewonnenen wasserunlöslichen Glucan kann durch Einwirkung von Ultraschall die Löslichkeit und dadurch die Bioverfügbarkeit erhöht und für eine zu behandelnde Person unerwünschte Nebenwirkungen verhindert werden.

Es ist auch möglich, das gewonnene wasserunlösliche Glucan sowohl chemisch, wie auch durch Ultraschall zu behandeln. Ferner ist es möglich, das gewonnene wasserunlösliche Glucan bei unterschiedlichen Temperaturen zu behandeln. Kurzzeitig kann das Autoklavieren des wasserunlöslichen Glucans bei Temperaturen bis 200 C erfolgen. Bei einer Zeit des Autoklavierens des wasserunlöslichen Glucans länger als 5 min kann dies bei Temperaturen bis 150 C erfolgen. Das wasserlösliche Glucan kann auch in einem Lösungsmittel DMSO einem Dehnströmvorgang unterworfen werden. Hierzu ist es möglich, daß das wasserlösliche Glucan durch eine Lochblende, eine poröse Kugelschüttung, eine Rollenmühle oder eine Einrichtung für eine Kapillarströmung geführt wird.

Patentasprüche

- 1 1. Verfahren zur Gewinnung hochmolekularer biologisch aktiver immunmodulierender Polysaccharide aus Hefe *Saccharomyces Cerevisiae*, dadurch gekennzeichnet, daß in einer ersten Verfahrensstufe A die Hefezellen durch Einwirkung von Scherkräften mechanisch soweit zerrissen werden, daß die Zellwände vom Zellinneren getrennt sind
5 und daß dann die Zellwandbestandteile von den Bestandteilen des Zellinneren getrennt werden, daß dann in einer zweiten Verfahrensstufe B das in der ersten Verfahrensstufe A gewonnene Zellwandmaterial gereinigt und getrocknet wird und daß dann das Zellwandmaterial in einer dritten Verfahrensstufe C einem enzymatischen Aufschluß unterzogen und das hierbei entstehende wasserunlösliche Glucan durch Zentrifugation
10 als Feststoff und wasserlösliche Mannan im Überstand gewonnen wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das in der ersten Verfahrensstufe A gewonnene Zellwandmaterial gefriergetrocknet wird.
- 15 3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die in der ersten Verfahrensstufe A gewonnenen Zellwandbestandteile durch Zentrifugation von den Bestandteilen des Zellinneren getrennt und vor der Gefriertrocknung gereinigt werden.
4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die in der ersten
20 Verfahrensstufe A gewonnenen Zellwandbestandteile an mikroporösen Membranen von den Bestandteilen des Zellinneren getrennt und durch Waschen vor der Gefriertrocknung gereinigt werden.
5. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die gefriergetrockneten
25 Zellwandbestandteile in einem Puffersystems bei einem pH-Wert von 3,0 bis 11 bei Temperaturen zwischen 20°C und 50°C über einen Zeitraum von vier bis 30 Stunden mit enzymatischen Aufschlußmitteln zur Reaktion gebracht werden.
6. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als enzymatisches
30 Aufschlußmittel Proteasen aus *Streptomyces griseus* und/oder Lyticase (Zymolyase) verwendet werden.

- 1 7. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als enzymatisches Aufschlußmittel Enzymcocktails aus *Helix pomatia* und/oder aus *Cytophaga* verwendet werden.
- 5 8. Verfahren nach Anspruch 1 und 2, 6 oder 7, dadurch gekennzeichnet, daß als enzymatisches Aufschlußmittel ein Gemisch aus Enzymen und Enzymcocktails verwendet wird.
9. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das gewonnene
10. wasserunlösliche Glucan chemisch durch Carboxymethylierung, Phosphatierung, Sulfatierung, Sulfonierung, Glycosidierung oder dergleichen in eine lösliche Form gebracht wird.
10. Verfahren nach Anspruch 1 dadurch gekennzeichnet, daß bei dem gewonnenen
- 15 wasserunlöslichen Glucan durch Einwirkung von Ultraschall die Löslichkeit erhöht und für eine zu behandelnde Person unerwünschte Nebenwirkungen vermindert werden.
11. Verfahren nach Anspruch 9 und 10, dadurch gekennzeichnet, daß das gewonnene wasserunlösliche Glucan sowohl chemisch wie auch durch Ultraschall behandelt wird.
- 20 12. Verfahren nach Anspruch 9 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß das gewonnene wasserunlösliche Glucan bei unterschiedlichen Temperaturen behandelt wird.
13. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß das Autoklavieren des
- 25 wasserunlöslichen Glucans kurzzeitig bei Temperaturen bis 200 C erfolgt.
13. Verfahren nach Anspruch 12 dadurch gekennzeichnet, daß das Autoklavieren des wasserunlöslichen Glucans länger als 5 min bei Temperaturen bis 150 C erfolgt.
- 30 15. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das wasserlösliche Glucan in einem Lösungsmittel DMSO einem Dehnströmungsvorgang unterworfen wird.
16. Verfahren nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß das wasserlösliche Glucan durch eine Lochblende, eine poröse Kugelschüttung, eine Rollenmühle oder eine
- 35 Einrichtung für eine Kapillarströmung geführt wird.



Glucan und Mannan

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 99/05681

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12P19/04 C12P39/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C12P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 82, no. 5, 3 February 1975 (1975-02-03) Columbus, Ohio, US; abstract no. 28265, SITNIKOV, V. S. ET AL: "Cell walls of Candida yeasts" XP002124912 abstract & GIDROLIZ. LESOKHIM. PROM-ST. (1974), (6), 5-6 , --- -/--	1-16

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier document but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

7 December 1999

Date of mailing of the international search report

27/12/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Douschan, K

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 103, no. 5, 5 August 1985 (1985-08-05) Columbus, Ohio, US; abstract no. 34603, SHIRAISHI, ATSUSHI ET AL: "Cell wall of Sporobolomyces red yeast" XP002124913 abstract & FUKUOKA JOSHI DAIGAKU KASEIGAKUBU KIYO (1985), 16, 47-54 , ----	1-16
Y	DATABASE WPI Section Ch, Week 199723 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 1997-252948 XP002124914 & JP 09 084529 A (KOHJIN CO LTD), 31 March 1997 (1997-03-31) abstract -----	1-16
Y	DE 30 17 372 A (KIRIN BEER K.K.) 20 November 1980 (1980-11-20) the whole document -----	1-16

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
JP 9084529	A	31-03-1997	NONE	
DE 3017372	A	20-11-1980	JP 1224274 C	15-08-1984
			JP 55148097 A	18-11-1980
			JP 58057153 B	19-12-1983
			JP 1408832 C	24-11-1987
			JP 55147224 A	17-11-1980
			JP 62013929 B	30-03-1987
			FR 2455893 A	05-12-1980
			GB 2048918 A,B	17-12-1980
			US 4313934 A	02-02-1982

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 103, no. 5, 5. August 1985 (1985-08-05) Columbus, Ohio, US; abstract no. 34603, SHIRAISHI, ATSUSHI ET AL: "Cell wall of Sporobolomyces red yeast" XP002124913 Zusammenfassung & FUKUOKA JOSHI DAIGAKU KASEIGAKUBU KIYO (1985), 16, 47-54 , ----	1-16
Y	DATABASE WPI Section Ch, Week 199723 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 1997-252948 XP002124914 & JP 09 084529 A (KOHJIN CO LTD), 31. März 1997 (1997-03-31) Zusammenfassung -----	1-16
Y	DE 30 17 372 A (KIRIN BEER K.K.) 20. November 1980 (1980-11-20) das ganze Dokument -----	1-16

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C12P19/04 C12P39/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 C12P

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 82, no. 5, 3. Februar 1975 (1975-02-03) Columbus, Ohio, US; abstract no. 28265, SITNIKOV, V. S. ET AL: "Cell walls of Candida yeasts" XP002124912 Zusammenfassung & GIDROLIZ. LESOKHIM. PROM-ST. (1974), (6), 5-6 , --- -/--	1-16



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

7. Dezember 1999

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

27/12/1999

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Beauftragter

Douschan, K

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Anhang zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/05681

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
JP 9084529	A	31-03-1997	KEINE	
DE 3017372	A	20-11-1980	JP 1224274 C	15-08-1984
			JP 55148097 A	18-11-1980
			JP 58057153 B	19-12-1983
			JP 1408832 C	24-11-1987
			JP 55147224 A	17-11-1980
			JP 62013929 B	30-03-1987
			FR 2455893 A	05-12-1980
			GB 2048918 A,B	17-12-1980
			US 4313934 A	02-02-1982